

Транскриптомный ответ *Lacticaseibacillus rhamnosus* на цитокины IL-8 и IL-10

Климина К.^{1, 2*}, Дьячкова М.², Веселовский В.¹, Захаревич Н.¹, Олехнович Е.¹

¹ Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины

им. академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

* ppp843@yandex.ru

Ключевые слова: комменсальная микробиота кишечника; иммуномодулирующие бактерии; иммунный ответ хозяина, цитокины; РНК-секвенирование; транскриптом; филогенетическое профилирование; фосфотрансферазная система

Мотивация и цель: Современные исследования подчеркивают динамическое взаимодействие между микробиотой кишечника и иммунной системой. Иммунные факторы, включая цитокины, оказывают значительное влияние на разнообразие кишечной микробиоты, влияя на ее состав и функциональность, что, в свою очередь, влияет на здоровье и иммунитет. Особое внимание стоит уделить лактобациллам и бифидобактериям, обладающим выраженными иммуномодулирующими свойствами. Эти микроорганизмы адаптируются к воздействию цитокинов, что способствует их выживанию и функционированию в кишечной среде. Данное исследование направлено на понимание механизмов взаимодействия микробиоты и организма хозяина, рассматривая микроорганизмы не только как возможных индикаторов изменений в состоянии хозяина, но и как активных участников в иммунном ответе. Это открывает новые подходы к регуляции иммунной системы через манипуляцию микробиоты и предлагает новые стратегии для улучшения здоровья человека. Однако ключевым аспектом работы является изучение двусторонней системы передачи сигналов, развившихся в процессе коэволюции организма хозяина и его микробиоты. В частности, исследуются короткие пептидные последовательности – цитокины, которые могут сигнализировать о воспалительных процессах и позволять микробиоте адаптироваться к предстоящему иммунному ответу, тем самым способствуя ее выживанию.

Методы и алгоритмы: В данной работе использовали штамм *L. rhamnosus* K32 (GenBank JNNV000000). Культивирование проводили в бульоне Lactobacillus MRS Broth (HiMedia) при 37 °C в анаэробных условиях (HiAnaerobic System, HiMedia). Ночную культуру штамма разводили в соотношении 1:100 в 2 мл среды. Экспериментальные образцы обрабатывали лиофилизированными рекомбинантными человеческими цитокинами – IL-8 и IL-10 в концентрациях 1 нг/мл (Thermo Fisher Scientific). Контрольная группа состояла из штамма *L. rhamnosus*, выращенного на среде MRS с добавлением деионизированной воды и рекомбинантного белка GFP (Thermo Fisher Scientific). Транскриптомный анализ проводили в экспоненциальной фазе роста (OD600 = 1.2). Эксперимент проводили в трех повторах. Тотальную РНК выделяли из 2 мл культуры клеток, предварительно обработав 1 мл реагента RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen) для стабилизации РНК. Клетки разрушали в 2 мл пробирках RNeasy Lysis Matrix B с помощью прибора MagNA Lyser (Roche) в течение 30 секунд. Для выделения РНК

использовали автоматическую станцию KingFisher Flex и набор MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific). Количество и качество выделенной РНК оценивали на флуориметре Qubit с набором Quant-it RiboGreen RNA assay kit (Thermo Fisher Scientific) и Bioanalyzer 2100 с чипом RNA 6000 Pico (Agilent Technologies) соответственно. Для приготовления транскриптомных библиотек брали 200 нг тотальной РНК. Удаление рибосомальной РНК проводили с помощью набора Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit (Illumina), библиотеки готовили с помощью набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB). Качество и размер библиотек оценивали с помощью набора High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies), а концентрацию библиотек измеряли набором Quant-iT DNA Assay Kit, High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific). После этого эквимольно объединяли библиотеки и разводили до конечной концентрации 12 пМ. Секвенирование проводили на платформе HiSeq 2500 (Illumina) с использованием набора HiSeq Rapid SBS Kit v2 (50 циклов) и HiSeq SR Rapid Cluster Kit v2, добавляли 1 % Phix (Illumina) в качестве внутреннего контроля. Контроль качества прочтений проводили с помощью FastQC v0.12.1. Выравнивание на референсный геном – с помощью HISAT2 v2.2.1. Оценку качества сопоставленных прочтений проводили QualiMap v.2.2.2-dev. Конвертацию из формата SAM в формат BAM, а также их сортировку и индексацию делали с помощью SAMtools v1.18. Подсчет прочтений, согласованных с геномными аннотациями, – с помощью featureCounts v2.0.6. Дифференциальную экспрессию генов (ДЭГ) определяли с помощью пакета edgeR 3.40.2 для R v4.1.2. Функциональная аннотация ДЭГ с помощью кластера ортологических генов (Cluster of Orthologous Genes, COG) с использованием инструмента reCOGnizer v1.10.1. Филогенетическое профилирование состояло из нескольких этапов: сначала определяли ортогруппы в геномах *Lacticaseibacillus*. Далее строились бинарные векторы для обозначения присутствия или отсутствия в геномах. Затем была создана матрица парных расстояний между этими векторами, после чего была проведена группировка филогенетических профилей (ФП) в программе OrthoFinder v.2.5.4. ФП были созданы для 163 полных геномов представителей *Lacticaseibacillus*, включая *L. rhamnosus* K32. Попарное расстояние между ФП рассчитывали с помощью меры Жаккара. Гены объединяли в группы на основании минимальных парных расстояний между ФП (отсечение = 0.001) в матрице расстояний, физической близости (в пределах 10 000 п. н.) в пределах одной ветви и совместной регуляции всех генов в группах. Для этого анализа был использован собственный скрипт Python v.3.10.2 (github.com/LabGenMO/phylo-profiling/blob/master/Identification%20of%20connected%20genes.ipynb).

Результаты: В ходе исследования проведена оценка воздействия цитокинов IL-8 и IL-10 на культуру *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Наши эксперименты показали, что присутствие в среде цитокинов IL-8 и IL-10 не влияет на скорость роста культуры. Однако эти цитокины могут влиять на экспрессию генов, не связанных с ростом клеток. Для дальнейшего понимания механизмов, лежащих в основе реакции лактобацилл на воспаление, мы провели высокопроизводительное секвенирование транскриптома штамма *L. rhamnosus* K32 в экспоненциальной фазе роста в экспериментальных и контрольных условиях в трех независимых биологических повторях. Было выявлено 57 ДЭГ для IL-8 и 72 для IL-10, экспрессия которых изменялась более чем в 2 раза ($FC \geq |2|$, $FDR < 0.05$). Функциональный анализ ДЭГ с пониженной экспрессией показал изменения в

категориях К (транскрипция), G (транспорт и метаболизм углеводов) и С (производство и преобразование энергии). В этих группах наблюдалось большое количество ДЭГ, общих для IL-8 и IL-10. Кроме того, для IL-10 наблюдалось повышение экспрессии гена (QJQ50_RS00105), относящегося к категории V (защитные механизмы), а для IL-8 – гена (QJQ50_RS04340), относящегося к категории M (Биогенез клеточной стенки/мембраны/оболочки). Анализ выявил значительную долю генов, связанных с фосфотрансферазной системой, которые демонстрировали снижение экспрессии после обработки обоими цитокинами. Эта система хорошо изучена с точки зрения ее участия в поглощении и утилизации углеводных субстратов. Наблюдаемое снижение экспрессии генов, связанных с транспортом и метаболизмом углеводов, производством и преобразованием энергии, а также транскрипцией, отражает уменьшение метаболической активности *L. rhamnosus* K32. Это указывает на адаптацию культуры в ответ на воздействие цитокинов IL-8 и IL-10, что является защитной реакцией на измененные условия окружающей среды. Для выявления предполагаемых оперонов в ДЭГ мы использовали ФП. Было выявлено десять предполагаемых оперонов в образцах, обработанных IL-8, и девять оперонов в образцах, обработанных IL-10, содержащих два или более функционально связанных гена. Обнаружение групп генов в одном опероне под воздействием IL-8 и IL-10 предполагает, что в ответ на эти цитокины бактерии могут регулировать ключевые биохимические пути. Это может иметь значительные последствия для их метаболизма, ответа на стресс и взаимодействия с иммунной системой хозяина. В свою очередь, это может способствовать адаптации бактерий к воспалительной среде или модуляции воспалительного процесса.

Выводы: Полученные результаты показывают, как воздействие противовоспалительных и провоспалительных цитокинов изменяет профили экспрессии у штаммов *L. rhamnosus* K32. Снижение активности генов, задействованных в энергетических процессах, таких как углеводный обмен и транспорт, стимулирует переход клеток в режим минимального взаимодействия с внешней средой. Этот адаптивный переход способствует экономии и перераспределению ресурсов для поддержания жизнеспособности клеток и активирует защитные механизмы в условиях воспалительного стресса.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-75-10029, <https://rscf.ru/project/22-75-10029/>.

Transcriptional responses of *Lactocaseibacillus rhamnosus* to IL-8 and IL-10 cytokines

Klimina K.^{1, 2*}, Dyachkova M.², Veselovsky V.¹, Zakharevich N.¹, Olekhnovich E.¹

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

² Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

* ppp843@yandex.ru

Key words: commensal gut microbiota; immunomodulatory bacteria; host immune response; cytokine signaling; RNA-sequencing; transcriptome; phylogenetic profiling; phosphotransferase system

Motivation and Aim: Current research highlights the dynamic interaction between the gut microbiota and the immune system. Immune factors, including cytokines,

significantly influence the diversity of the gut microbiota, affecting its composition and functionality, which in turn impacts health and immunity. Special attention should be given to lactobacilli and bifidobacteria, which possess pronounced immunomodulatory properties. These microorganisms adapt to the effects of cytokines, which aids their survival and function in the gut environment. This study aims to understand the mechanisms of interaction between the microbiota and the host organism, considering microorganisms not only as potential indicators of changes in the host's condition but also as active participants in the immune response. This opens up new approaches to regulating the immune system through manipulation of the microbiota and offers new strategies for improving human health. However, a key aspect of this research is the study of the bidirectional signaling system that has evolved through the coevolution of the host and its microbiota. In particular, short peptide sequences (cytokines) are investigated, which can signal inflammatory processes and allow the microbiota to adapt to an upcoming immune response, thereby facilitating its survival.

Methods and Algorithms: In this study, we used the strain *L. rhamnosus* K32 (GenBank JNNV000000). Cultivation was carried out in Lactobacillus MRS Broth (HiMedia) at 37 °C under anaerobic conditions (HiAnaerobic System, HiMedia). The overnight culture of the strain was diluted in a ratio of 1:100 in 2 ml of medium. Experimental samples were treated with lyophilized recombinant human cytokines – IL-8 and IL-10 at concentrations of 1 ng/ml (Thermo Fisher Scientific). The control group consisted of *L. rhamnosus* cultured in MRS medium with the addition of deionized water and recombinant GFP protein (Thermo Fisher Scientific). Transcriptomic analysis was conducted during the exponential growth phase (OD600 = 1.2). The experiment was carried out in triplicate. Total RNA was extracted from 2 ml of cell culture, after treating 1 ml with RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen) for RNA stabilization. Cells were lysed in 2 ml Lysing Matrix B tubes using the MagNA Lyzer (Roche) for 30 seconds. RNA was extracted using the KingFisher Flex automated station and the MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific). The quantity and quality of the extracted RNA were assessed on a Qubit fluorometer with the Quant-it RiboGreen RNA assay kit (Thermo Fisher Scientific) and the Bioanalyzer 2100 with the RNA 6000 Pico chip (Agilent Technologies), respectively. For the preparation of transcriptomic libraries, 200 ng of total RNA was used. Ribosomal RNA removal was performed using the Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit (Illumina), and libraries were prepared using the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB). The quality and size of the libraries were evaluated using the High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies), and the library concentration was measured with the Quant-iT DNA Assay Kit, High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific). Libraries were then equimolarly pooled and diluted to a final concentration of 12 pM. Sequencing was performed on the HiSeq 2500 platform (Illumina) using the HiSeq Rapid SBS Kit v2 (50 cycles) and HiSeq SR Rapid Cluster Kit v2, with 1 % Phix (Illumina) added as an internal control. Quality control of the reads was conducted using FastQC v0.12.1. Alignment to the reference genome was performed using HISAT2 v2.2.1. Quality assessment of aligned reads was done with QualiMap v.2.2.2-dev. Conversion from SAM to BAM format, as well as their sorting and indexing, were performed using SAMtools v1.18. Counting of reads aligned with genomic annotations was done using featureCounts v2.0.6. Differential gene expression (DGE) was determined using the edgeR package 3.40.2 for R v4.1.2. Functional annotation of DGE was performed using the cluster of orthologous genes (COG) system with the tool reCOGnizer v1.10.1. Phylogenetic profiling consisted of several stages:

firstly, ortho groups were identified in *Lacticaseibacillus* genomes. Binary vectors were then constructed to denote the presence or absence in genomes. A matrix of pairwise distances between these vectors was created, after which phylogenetic profiles (PP) were clustered using OrthoFinder v.2.5.4. PPs were created for 163 complete genomes of *Lacticaseibacillus* representatives, including *L. rhamnosus* K32. Pairwise distances between PPs were calculated using the Jaccard measure. Genes were grouped based on the minimal pairwise distances in the distance matrix (cutoff = 0.001), physical proximity (within 10,000 bp) within a branch, and co-regulation of all genes in groups. This analysis was performed using a custom Python script v.3.10.2 (github.com/LabGenMO/phylo-profiling/blob/master/Identification%20of%20connected%20genes.ipynb).

Results: During the study, we evaluated the impact of cytokines IL-8 and IL-10 on the culture of *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Our experiments demonstrated that the presence of IL-8 and IL-10 in the medium does not affect the growth rate of the culture. However, these cytokines can influence the expression of genes unrelated to cell growth. To further understand the mechanisms underlying the lactobacilli's response to inflammation, we performed transcriptomic sequencing of the *L. rhamnosus* K32 strain during its exponential growth phase under experimental and control conditions in three independent biological replicates. We identified 57 differentially expressed genes (DEGs) for IL-8 and 72 for IL-10, with expression changes of more than two-fold ($FC \geq |2|$, $FDR < 0.05$). Functional analysis of the downregulated DEGs revealed changes in categories K (transcription), G (carbohydrate transport and metabolism), and C (energy production and conversion). These groups showed a significant number of DEGs common to both IL-8 and IL-10. Additionally, for IL-10, there was an increase in the expression of gene (QJQ50_RS00105) belonging to category V (defensive mechanisms), and for IL-8, an increase in gene (QJQ50_RS04340) belonging to category M (biogenesis of cell wall/membrane/envelope). The analysis revealed a significant proportion of genes associated with the phosphotransferase system, which downregulated after treatment with both cytokines. This system is well-studied for its role in the uptake and utilization of carbohydrate substrates. The observed decrease in the expression of genes related to carbohydrate transport and metabolism, energy production and conversion, and transcription reflects a decrease in the metabolic activity of *L. rhamnosus* K32. This indicates an adaptation of the culture in response to the cytokines IL-8 and IL-10, which is a protective response to the changed environmental conditions. To identify putative operons in DEGs, we used phylogenetic profiling. Ten putative operons were identified in samples treated with IL-8, and nine operons in samples treated with IL-10, containing two or more functionally linked genes. The detection of these gene groups in a single operon under the influence of IL-8 and IL-10 suggests that in response to these cytokines, bacteria may regulate key biochemical pathways. This could have significant implications for their metabolism, stress response, and interaction with the host immune system. In turn, this may contribute to bacterial adaptation to the inflammatory environment or modulation of the inflammatory process.

Conclusions: The results demonstrate how the exposure to anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines alters the expression profiles in strains of *L. rhamnosus* K32. The reduction in the activity of genes involved in energy processes, such as carbohydrate exchange and transport, stimulates the transition of cells to a mode of minimal interaction with the external environment. This adaptive transition facilitates the conservation and redistribution of resources to maintain cell viability and activates protective mechanisms in conditions of inflammatory stress.

Funding: Financial support for this study was provided by the Russian Science Foundation under the grant number 22-75-10029, available at <https://rscf.ru/project/22-75-10029/>.